



Universidad de Sevilla (US)

Facultad de Farmacia



MÉTODOS RÁPIDOS DE DETECCIÓN DE COVID-19



Ivana Gallego García



Universidad de Sevilla (US)
Facultad de Farmacia
Departamento de Química Analítica
Grado en Farmacia



MÉTODOS RÁPIDOS DE DETECCIÓN DE COVID-19

TRABAJO FIN DE GRADO

Revisión bibliográfica

Ivana Gallego García

Tutora: Noelia Tena Pajuelo

En Sevilla, junio 2021

RESUMEN

El SARS-CoV-2 apareció en Wuhan (China) el 31 de diciembre de 2019 causando la actual pandemia mundial declarada por la OMS el 11 de marzo de 2020. Se trata de un nuevo coronavirus, perteneciente a la familia *Coronaviridae*, al género *Betacoronavirus* y al subgénero *Sarbecovirus*. Este virus produce la enfermedad conocida hoy en día como COVID-19, la cuál produce el Síndrome Agudo Respiratorio Severo. El SARS-CoV-2 es altamente contagioso, es por eso por lo que los métodos de detección son muy importantes para poder frenar la propagación del virus ya que, debido a la saturación de los centros sanitarios, así como del personal sanitario, un diagnóstico rápido de la enfermedad puede ser crucial para contener nuevos brotes. En este manuscrito se describen y discuten las distintas técnicas de detección empleadas en la actualidad para detectar el SARS-CoV-2. Para ello se ha realizado una búsqueda bibliográfica profunda a través de diferentes bases de datos, guías clínicas, artículos científicos y páginas web.

Actualmente, la técnica más utilizada es la qRT-PCR, transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa, conocida también como método clásico o estándar, basada en detectar el ARN viral. Esta técnica tiene una gran sensibilidad y especificidad, pero el proceso y el tiempo para obtener los resultados es largo, lo que dificulta aún más la rapidez en el diagnóstico de la enfermedad. Es por eso por lo que se han desarrollado alternativas a este método, como los tests rápidos de antígenos, que detectan proteínas virales, los cuáles puede dar resultados en unos 30 minutos, pero únicamente de manera cualitativa. Así como las pruebas serológicas de anticuerpos, que no detectan la infección activa, si no los anticuerpos generados una vez superada la infección, lo que es muy importante para determinar la cantidad de personas que están inmunizadas. Por otro lado, hay numerosas técnicas en investigación y desarrollo como es el caso de los biosensores que tienen un gran potencial para el futuro, y el desarrollo de herramientas y técnicas a través de inteligencia artificial, lo cual podría mejorar en gran medida la situación actual. Actualmente, la mejor forma de detectar el SARS-CoV-2 es a través de la qRT-PCR combinado con los tests rápidos y pruebas serológicas.

Palabras claves: SARS-CoV-2, COVID-19, detección, qRT-PCR, antígeno

ABSTRACT

SARS-CoV-2 emerged in Wuhan (China) on 31 December 2019 causing a global pandemic declared by WHO on 11 March 2020. It is a new coronavirus, belonging to the family *Coronaviridae*, genus *Betacoronavirus* and subgenus *Sarbecovirus*. This virus produces the disease known as COVID-19, which causes the Severe Acute Respiratory Syndrome. This virus is highly contagious, so that detection methods are very important in order to stop the spread of the virus. Due to the overcrowding of health care facilities as well as health care workers, a rapid diagnosis of the disease can be crucial to contain new outbreaks. In this manuscript, the different detection techniques currently used to detect SARS-CoV-2 are discussed. For this purpose, a in-depth literature search has been carried out through different databases, clinical guidelines, scientific articles, and websites.

Currently, the most widely used technique is qRT-PCR, also known as the classical or standard method, based on detecting viral RNA. This technique has a high sensitivity and specificity, but the process and time to obtain the results is long, which makes it even more difficult to diagnose the disease quickly. Therefore, alternatives to this method have been developed, such as rapid antigen tests, which detect viral proteins, which can give results in 30 minutes, but only qualitatively. As well as serological antibody tests, which do not detect active infection, but only the antibodies generated once the infection has passed, which is very important to determine the number of people who are immunised. On the other hand, there are numerous techniques in research and development such as biosensors that have great potential for the future, as well as the development of tools and techniques through artificial intelligence, which could greatly improve the current situation. Currently, the best way to detect SARS-CoV-2 is through qRT-PCR combined with rapid tests and serological tests.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, detection, qRT-PCR, antigen

INDICE

1.	<i>INTRODUCCIÓN</i>	8
1.1.	ORIGEN Y ANTECEDENTES	8
1.2.	ESTRUCTURA DEL SARS-COV-2	8
1.3.	VÍAS DE TRANSMISIÓN	100
1.4.	PREVENCIÓN	10
1.5.	SÍNTOMAS DE LA COVID-19.....	11
1.6.	DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD	12
2.	<i>OBJETIVOS</i>	18
3.	<i>METODOLOGÍA</i>	19
4.	<i>RESULTADO Y DISCUSIÓN</i>	20
4.1.	MÉTODOS QUE DETECTAN ARN MONOCATENARIO DEL SARS-CoV-2.....	20
4.1.1.	RT-PCR en un solo paso.....	20
4.1.2.	RT- LAMP (Reverse-transcription Loop-mediated isothermal amplification)	21
4.1.3.	CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats).....	22
4.2.	MÉTODOS QUE DETECTAN ANTÍGENOS VIRALES.....	23
4.3.	MÉTODOS QUE DETECTAN ANTICUERPOS.....	25
4.3.1.	Ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral (LFIA).	27
4.3.2.	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)	28
4.3.3.	Inmunoensayo enzimático de quimioluminiscencia (CLIA)	28
4.4.	VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL SARS-CoV-2.....	30
4.5.	OTROS MÉTODOS ALTERNATIVOS EN DESARROLLO.....	32
4.6.	MÉTODOS DIGITALES BASADOS EN INTELIGENCIA ARTIFICIAL	34
5.	<i>CONCLUSIONES</i>	36
6.	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	37

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ORIGEN Y ANTECEDENTES

El SARS-CoV-2 fue detectado por primera vez en Wuhan (China) el 31 de diciembre de 2019 y no fue hasta el 31 de enero de 2020 cuando se diagnosticó el primer caso en España, en concreto en La Gomera (Canarias) (Gestoso-Pecellín et al., 2020). El 11 de marzo de 2020, la OMS declara la situación de pandemia (Ruiz-bravo y Jimenez-Valera, 2020) y designó a la enfermedad producida por el SARS-CoV-2 como la COVID-19 (Reina y Fraile, 2020).

Recibe este nombre porque se asemeja al coronavirus SARS-CoV-1, el cuál apareció en el año 2002 y provocó el Síndrome Agudo Respiratorio Severo (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*) (Bautista Moreno et al., 2020). Este tenía una alta tasa de contagiosidad y el último caso confirmado fue a finales de 2003. En 2012, apareció el que se conoce como MERS-CoV en Oriente Medio y que también produjo numerosos casos de procesos respiratorios severos. Tanto el SARS-CoV-1, SARS-CoV-2 y MERS-CoV pertenecen al orden *Nidovirales*, a la familia *Coronaviridae* y al género *Betacoronavirus*. Dentro de este género, en concreto el SARS-CoV-2 pertenece al subgénero *Sarbecovirus*, al linaje 2b (Reina y Fraile, 2020).

Desde el inicio de la pandemia en España, se han producido cuatro olas de contagios, siendo la segunda la más grave. Actualmente a 28 de junio de 2020 han fallecido 80.829 personas a causa de esta nueva enfermedad (Ministerio de Sanidad, 2020a).

1.2. ESTRUCTURA DEL SARS-COV-2

Los coronavirus son virus redondeados que tienen un tamaño aproximado de unos 120-160 nm de diámetro. Se les asigna este nombre por su aspecto parecido a una corona solar (Reina y Fraile, 2020). En la envoltura lipídica podemos encontrar cuatro proteínas estructurales: la proteína de la membrana (M), la glucoproteína de espiga (S), la proteína de la envoltura (E) y las proteínas de la nucleocápside (N) que constituyen la cápside donde se encuentra el genoma (Wang et al., 2020). La Figura 1 muestra la localización y forma de estas proteínas en la estructura del SARS-CoV-2.

Además, de estas 4 proteínas estructurales, el SARS-CoV-2 contiene unas 23 proteínas no estructurales (NSPs) entre las cuales se encuentra la ARNpolimerasa dependiente de ARN (RdRP) (Udugama et al., 2020).

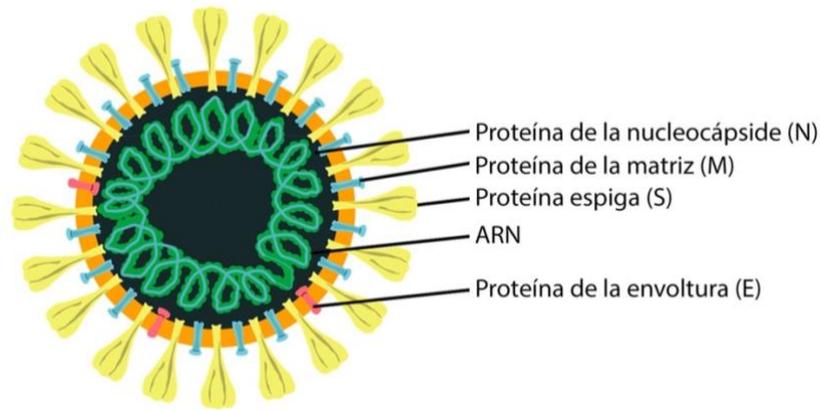


Figura 1: Estructura SARS-CoV-2. Modificado de (Udugama et al., 2020).

El SARS-CoV-2 está formado por una sola cadena de ARN (monocatenario) de sentido positivo que contiene 29.891 nucleótidos de longitud, según se publicó el 10 de enero de 2020 (GenBank:mn908947). Tiene una similitud de un 96,3% con el genoma del coronavirus BatCoV-RaTG13 detectado en los murciélagos. Sin embargo, no tanta con el SARS-COV-1 y MERS-CoV, (Yuan et al., 2020), de ahí las diferencias en los distintos síntomas y características de la clínica. El genoma del SARS-CoV-2 contiene cinco marcos de lecturas abiertos (ORF: *Open Reading frames*) en sentido 5'-3' (ORF 1a/b, ORF 3a/b, ORF 6, ORF 7a/b, ORF 8, ORF 9a/b, ORF 10, ORF 14) como se puede observar en la Figura 2.

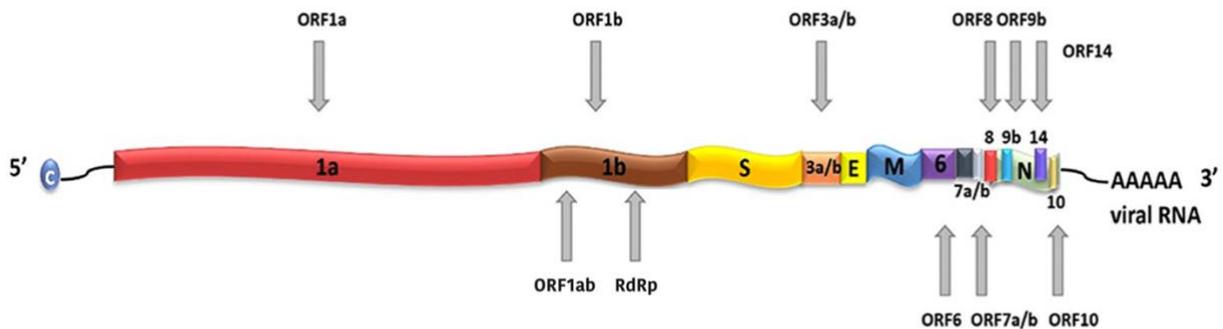


Figura 2: Representación esquemática del genoma del SARS-CoV-2. Modificado de (D'Cruz et al., 2020)

Es importante destacar que, en concreto, la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) se encuentra en el ORF1ab ya que tiene un papel fundamental en las posibles mutaciones y recombinaciones del ARN viral (Engelmann et al., 2021).

El gen S codifica las proteínas de espiga, gracias a las cuales el virus puede unirse a los receptores de las células, fusionarse con la membrana de éstas e infectarlas. Por lo tanto, éstas proteínas son las que determinan el tropismo del hospedador, así como la capacidad de transmisión. Este gen tiene menos de un 75% de similitud en la secuencia de nucleótidos con respecto a los otros coronavirus conocidos y mencionados anteriormente. Sin embargo, las otras tres proteínas estructurales son más parecidas y necesarias en las funciones generales de los diferentes tipos de coronavirus (Udugama et al., 2020).

En cuanto al mecanismo de acción, la proteína S se une de manera directa al receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) de las células del hospedador, las cuáles se expresan en diferentes órganos como pulmones, riñones e intestino. Estos receptores ACE2 también forman parte del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA) (Vitiello et al., 2021). La afinidad de la proteína S a estos receptores es muy elevada (Arandia-Guzmán y Antezana-Llaveta, 2020), por lo que se concluye así que la proteína S es la responsable de que el SARS-CoV-2 sea más virulento que el resto de coronavirus y por consiguiente que tenga una mayor importancia como objetivo terapéutico.

1.3. VÍAS DE TRANSMISIÓN

Según publica la OMS, la principal vía de infección es a través de gotículas respiratorias con un diámetro de unos 5-10 μm aprox. (transmisión por gotículas) o núcleos goticulares con un diámetro inferior a 5 μm (transmisión aérea). Es por eso por lo que se debe evitar el contacto estrecho entre personas (menos de 1,5 metro). Otra posible vía sería a través de fómites, es decir contagio por contacto con una superficie infectada como, por ejemplo, contacto con gotículas depositadas en un pomo de una puerta. Sin embargo, se ha demostrado que la tasa de infección a través de esta vía es ínfima (WHO, 2020a).

1.4. PREVENCIÓN

Según las recomendaciones sanitarias, las medidas de prevención contra la COVID-19 son las que se resumen en la Figura 3 (Ministerio de Sanidad, 2020b).

Actualmente, España se encuentra en proceso de vacunación siguiendo un protocolo de vacunación en el que se divide a la población en distintos grupos en función de la prioridad. Contamos con 4 vacunas: Comirnaty (Pfizer-BioNTech) y Moderna, que son vacunas de ARN mensajero monocatenario viral, AstraZeneca, que está compuesta por un vector de adenovirus de chimpancé y Jassen (Johnson&Johnson), compuesta por un vector de adenovirus humano tipo 26 (EMA, 2021). Además de estas cuatro vacunas, se han desarrollado otra dos diferentes, pero actualmente no han sido supervisadas por la EMA (Agencia Europea del Medicamento) y por lo

tanto no se están utilizando en Europa. Estas dos son: Sputnik V la cual está compuesta también por un vector de adenovirus humano tipo 26 y Sinovac (Corona Vac) la cual tiene un mecanismo diferente, ya que contiene partículas inactivadas del virus (Gaus, 2021). En cuanto a la relación eficacia/coste de cada una de ellas esta se recoge en la Tabla 1.



Figura 3: Recomendaciones del Ministerio de Sanidad frente a la COVID-19. “Las 6M siempre en mente”.

Tabla 1: Eficacia de las distintas vacunas desarrolladas para el COVID-19. Modificado de (Gaus, 2021).

VACUNAS	EFICACIA (%)	COSTE (€)
Pfizer-bioNTech	95	12,10- 16,70
Moderna	96	15,00-27,60
AstraZeneca	79	2,20-4,40
Jassen	66	7,10
Sputnik V	92	8,30
Sinovac	50-83	11,40

1.5. SÍNTOMAS DE LA COVID-19

Las manifestaciones clínicas más frecuentes detectadas para la COVID-19 son: fiebre, tos seca, fatiga, falta de aire, dolor muscular, confusión, dolor de cabeza, dolor de garganta, rinorrea, dolor en el pecho, diarrea, náuseas, vómitos, esputo, escalofríos, hemoptisis, disnea, neumonía bilateral, leucopenia, linfopenia, pérdida de olfato y gusto y altos niveles de citoquinas en sangre (Baj et al., 2020). La Tabla 2 muestra de forma resumida los niveles de la enfermedad según los síntomas que se padecen.

Tabla 2: Niveles de enfermedad según síntomas que cursan con la COVID-19.

NIVELES DIFERENTES DE COVID-19	
<i>LEVE</i>	Fiebre, tos, fatiga, opacidad pulmonar leve, disnea, leve neumonía
<i>SEVERO</i>	Saturación de oxígeno en sangre $\leq 93\%$, frecuencia respiratoria $\geq 30/\text{min}$, la relación entre la presión parcial de oxígeno arterial y la fracción de oxígeno inspirado < 300 , y/o el oxígeno infiltrado en los pulmones $> 50\%$ en un plazo de 24/40 horas \rightarrow necesidad de UCI
<i>CRÍTICO</i>	Síndrome de dificultad respiratoria aguda, fallo respiratorio, shock séptico, disfunción o fallo multiorgánico, disfunción en la coagulación, acidosis metabólica, muerte.

1.6. DETECCIÓN, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD

Respecto al tratamiento, no hay evidencia científica de ensayos clínicos para recomendar un tratamiento específico. Pero, si es importante, asegurar un tratamiento de soporte precoz que consiste en administrar antimicrobianos para tratar los agentes etiológicos del síndrome de distrés respiratorio agudo, no administrar corticoides de forma rutinaria y adaptar el tratamiento a cada persona y su estado (Fisterra, 2021).

En cuanto a la detección, el método estándar (*Gold Standar*) por excelencia es la qRT-PCR (*Real-time Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction*). Este es el método más seguro y eficaz y el que se utiliza de manera mayoritaria para detectar la infección por SARS-CoV-2. Posteriormente, en la parte central del trabajo se exponen alternativas a este método, todas ellas efectivas y sensibles, condicionadas a su vez por el fundamento y desarrollo del método, la carga viral y la respuesta inmunológica del paciente (Mattioli et al., 2020).

La RT-PCR o reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real, es una variante de la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) común (Salazar Carranza et al., 2020). Esta prueba consiste en aislar el ADN de una muestra y obtener millones de copias de la región concreta de ADN que sea de interés en pocas horas, consiguiendo así la cantidad de ADN suficiente para poder analizarlo. Una vez que tomamos la muestra y aislamos el ADN se inician lo que se conoce como los ciclos de la PCR: por cada ciclo, se duplica el ADN diana, por lo que en 30-40 ciclos, se obtendrían millones de copias. En cada ciclo ocurren tres pasos: desnaturalización, hibridación y elongación. La qRT-PCR se realiza igual que la PCR estándar, pero realizando un paso previo debido a que el SARS-CoV-2 está formado por ARN viral, por lo

que habría que convertir el ARN en ADN (Salazar Carranza et al., 2020). A continuación, se detalla en que consiste este método.

En primer lugar, se toma la muestra del paciente. De manera general, se toman dos muestras: una del tracto respiratorio superior, que suele ser una muestra nasofaríngea, y otra de tracto respiratorio inferior, que suele ser una muestra orofaríngea. Ambas muestras se toman con el mismo hisopo, que normalmente son hisopos floculados de dacrón o poliéster. Una vez tomada la muestra, se introduce en un medio de transporte de virus (MTV) (WHO, 2020b), que consiste en una solución isotónica que contiene proteínas para proteger la estructura del virus, antibióticos para inhibir la contaminación microbiana, así como distintos buffers para controlar el pH (Engelmann et al., 2021). La muestra se conserva en esta disolución para transportarla hasta el laboratorio dónde serán analizadas. Durante su conservación y/o transporte se debe mantener a una temperatura de 2-8 °C si el tiempo es igual o menor a 12 días, o a -70 °C si va a conservarse más de 12 días. Las muestras deben ser analizadas en laboratorios de bioseguridad de nivel 2 (Martín et al., 2021). Otro tipo de muestras que también podría utilizarse en función del tipo de paciente sería: lavado broncoalveolar, aspirado traqueal, esputo, tejidos de biopsia o autopsia, suero, sangre o heces (WHO, 2020b).

Una vez tomada la muestra se llevan a cabo los siguientes pasos:

1) Aislamiento del ARN viral: se purifica y se extrae el ARN viral para eliminar cualquier resto de contaminación de ADN (Ohan y Heikkila, 1993). Normalmente este paso se realiza siguiendo las instrucciones de cada kit comercial (Martín et al., 2021).

Una vez realizado este paso, el resto de ellos se realizan utilizando un termociclador (Mas et al., 2001). El ARN purificado se mezcla con una solución llamada “master mix” que contiene una solución tampón para regular el pH, los cebadores o “primers”, sondas o “probes”, la enzima de transcripción inversa, distintos nucleótidos, y la ADN polimerasa, y se introduce dentro del termociclador (Martín et al., 2021).

2) Transcripción inversa: consiste en transformar la cadena monocatenaria de ARN en ADNc a través de la enzima ADN polimerasa dependiente de ARN (transcriptasa inversa) para lo cual necesita un *primer* específico colocado en el extremo 3’ para iniciar la reacción (Ohan y Heikkila, 1993).

3) PCR: el ADNc de doble cadena obtenido se somete a la reacción en cadena de la polimerasa. Existen ligeras diferencias entre la PCR estándar con ADN y con ADNc (Ohan y Heikkila, 1993). Este proceso se divide en tres etapas:

a) Desnaturalización: la doble hélice de ADNc se separa en dos hebras. Este primer paso dura aproximadamente 30 segundos/ 1 minuto y se necesita una temperatura de entre 93-97 °C (Mas et al., 2001).

- b) Hibridación: el *primer* se une a la zona 5' de una de las cadenas. Esto se produce gracias a una disminución de temperatura entre 50-65 °C y tiene una duración de 30 segundos/ 1 minuto (Mas et al., 2001). Los *primers* son secuencias complementarias de diferentes regiones del ARN viral (monocatenario), como el gen de la proteína E, el gen de la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp), el gen de la proteína N (D'Cruz et al., 2020), el gen de la proteína S y regiones como ORF1b o ORF8 (Carter et al., 2020). De manera que, de estar presente el virus en la muestra analizada la hebra del ADNc del virus se apareará con estas secuencias (D'Cruz et al., 2020). Por otro lado, a la otra cadena se unen los *probes* o sondas que son pequeñas cadenas de ADN que tienen en el extremo 5' una molécula de fluoróforo y en el extremo 3' un *quencher* (Martín et al., 2021).
- c) Elongación: se sintetizan las nuevas cadenas de ADN, una en sentido 5'-3' y otra en sentido 3'-5', mediante una enzima ADN polimerasa termoestable, en concreto, la Taq polimerasa la cual es producida por la bacteria *Thermus aquaticus*. Este proceso se lleva a cabo en una temperatura de unos 70-72 °C aproximadamente (Mas et al., 2001).

Todos estos pasos constituyen un ciclo (Figura 4), por lo que esto se repite unos 30-40 ciclos para poder detectar el virus (Mas et al., 2001). La detección de los productos se produce gracias a la fluorescencia que se genera, es decir, lo que se conoce como el "efecto Quencher". Como se explica anteriormente, los *probes* contienen en un extremo la molécula de fluoróforo y en el otro el *quencher*. El *quencher* lo que hace es inhibir la fluorescencia que emite la molécula de fluoróforo cuando es excitada por el termociclador, de manera que mientras ambos estén cerca, no se emitirá fluorescencia, pero cuando se produce la extensión de la nueva cadena, la polimerasa los separa, haciendo que la molécula de fluoróforo quede libre y por lo tanto emita fluorescencia (Martín et al., 2021). Para interpretar estos resultados, se determina lo que se conoce como el valor del umbral de ciclos (Ct), que puede variar según el protocolo. El umbral de ciclos hace referencia al número de ciclos de replicación necesarios para producir señal de fluorescencia, es decir, el primer ciclo de PCR en el que se detecta fluorescencia (Figura 4) (Ade et al., 2021). Por lo que existe una relación inversamente proporcional entre el número de ciclos y la carga viral: a menor número de ciclos, mayor es la carga viral (Martín et al., 2021). Existen varios estudios para establecer el número de Ct necesarios para considerar una muestra como positiva, existiendo discrepancias respecto a esto. Por un lado, hay estudios que dicen que un Ct < 40 se considera positivo, sin embargo, hay otros que consideran valores de Ct >30 como muestras negativas. Además, valores de Ct entre 15-24 se consideran muestras con una alta carga viral y muestras con un Ct entre 25-30 se consideran que poseen una carga viral moderada. Según la recomendación del CDC (*Chinese Center for Disease Control and Prevention*) se consideran negativas las muestras con un Ct >40 (Folorunso Sule y Oladimeji Oluwayelu, 2020).

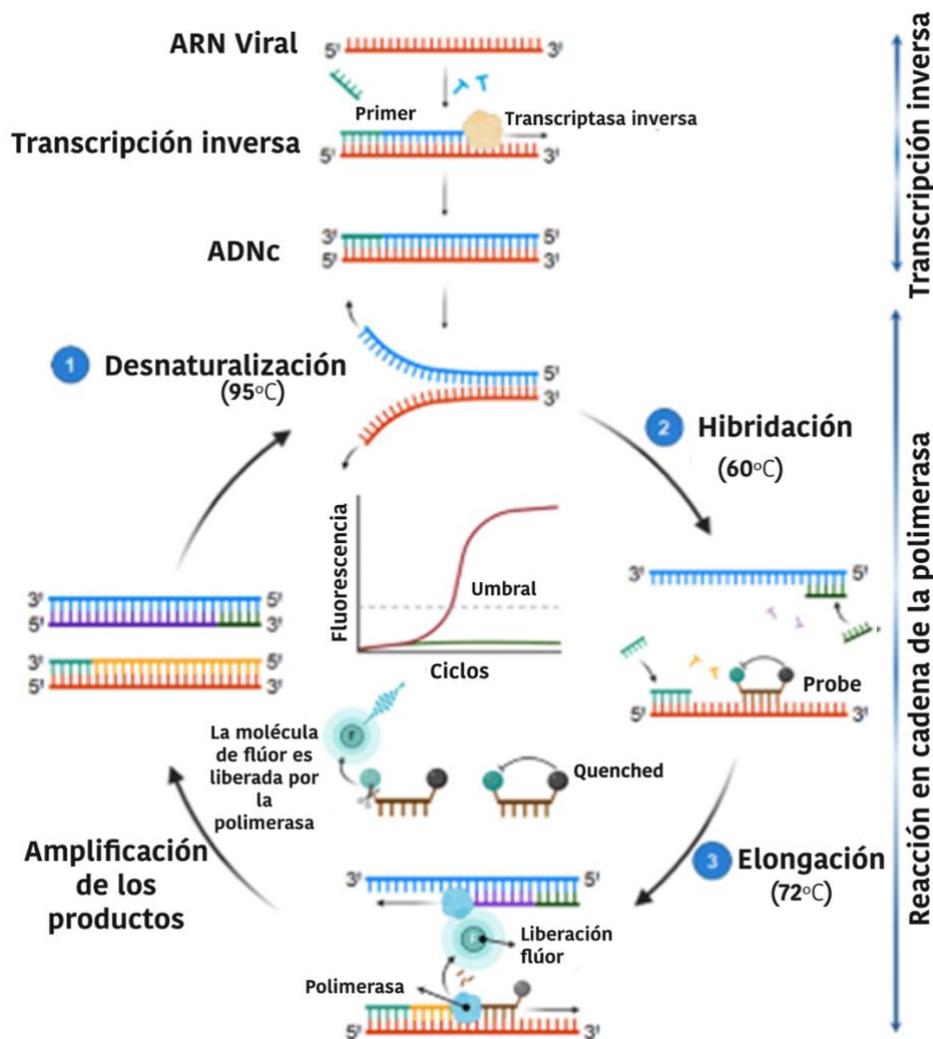


Figura 4: Representación del proceso de qRT-PCR. (Afzal, 2020)

Debido a la actual emergencia sanitaria, rápidamente se desarrollaron numerosos kits RT-PCR para comercializarse. De hecho, en abril de 2020, el 89% de los productos desarrollados fueron autorizados con emergencia por la FDA (*United States Food and Drug Administration*) (Feng et al., 2020). Por otro lado, hay que tener en cuenta también que cada kit comercial tiene sus propios *primers* y *probes* y es ahí dónde se diferencian unos de otros. La Organización Mundial de la Salud (WHO) publicó varios “sets” donde se recoge los diferentes *primers* (cebadores) y *probes* que han sido desarrollados en China, Alemania, Japón, Tailandia, Hong-Kong y Estados Unidos, como se puede observar en la Tabla 3 (D’Cruz et al., 2020). Es precisamente en estos *primers* y *probes* donde se producen desajustes de emparejamiento con el genoma del virus cuando se producen mutaciones en éste, haciendo que disminuya la sensibilidad de la prueba y por lo tanto que pueda aparecer falsos negativos (WHO, 2020b).

Tabla 3: Diferentes Primers/Probes para los test de RT-PCR (Udugama et al., 2020).

Institution	Gene target	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Probe (5'-3')
U.S. CDC ¹⁴	N gene	N1: GACCCCAAAATCAGCGAAAT N2: TTACAAACATTGGCCGAAA N3: GGGAGCCTTGAATACACCAAAA RP-F RNase: AGATTGGACCTGCGAGCG	N1: TCTGGTACTGCCAGTTGAATCTG N2: GCGCGACATTCCGAAGAA N3: TGTAGCAGATTGCAGCATTG RP-RRNase: GAGCGGCTGTCTCCACAAGT	N1: FAM-ACCCCGCATTACGTTTG GTGGACC-BHQ1 N2: FAM-ACAATTTGCCCCAGC GCTTCAG-BHQ1 N3: FAM-AYCACATTGGCACCCGC AATCCTG-BHQ1 RP-P RNase: FAM-TTCTGACCTGAAGGCTC TGCGCG- BHQ-1
China CDC ¹⁵	ORF1ab and N gene	ORF1ab: CCCTGTGGGTTTTACACTTAA N: GGGGAACCTCTCTGCTAGAAT	ORF1ab: ACGATTGTGCATCAGCTGA N: CAGACATTTTGTCTCAAGCTG	ORF1ab: FAM- CCGTCTGCGGTATGTGGAAAG GTTATGG-BHQ1 N: FAM-TTGTCTGCTGCTTGA CAGATT-TAMRA
Charité, Germany ¹⁶	RdRp, E, N gene	RdRp: GTGARATGGTCATGTGTGGCGG E: ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT	RdRp: CARATGTTAAASACACTATTAGCATA E: ATATTGCAGCAGTACGCACACA	RdRp 1: FAM-CAGGTGGAACCTCATC AGGAGATGC-BBQ RdRp 2: FAM-CCAGGTGGWACRTCATC MGGTGATGC-BBQ E: FAM-ACACTAGCCATCCTTA CTGCGCTTCG-BBQ
Hong Kong University ¹⁷	ORF1b-nsp14, N gene	ORF1b-nsp14: TGGGGYTTTACRGGTAACCT N: TAATCAGACAAGGAACTGATTA	ORF1b-nsp14: AACRCGCTTAACAAAGCACTC N: CGAAGGTGTGACTTCCATG	ORF1b-nsp14: FAM-TAGTTGTGATGCWATC ATGACTAG-TAMRA N: FAM-GCAAATTGTGCA ATTTGCGG-TAMRA
National Institute of Infectious Diseases, Japan ¹⁸	N gene	N: AAATTTTGGGGACCAGGAAC	N: TGCCAGCTGTGTAGGTCAAC	N: FAM-ATGTCGCGCAT TGCCATGGA-BHQ
National Institute of Health, Thailand ¹⁹	N gene	N: CGTTTGGTGGACCCTCAGAT	N: CCCCACTGCGTTCTCCATT	N: FAM- CAACTGGCAGTAACCAQBH1

Sin embargo, la qRT-PCR tiene numerosas limitaciones como instrumentación compleja y cara, necesidad de personal formado y, además, es muy importante mencionar la posibilidad de falsos negativos en esta prueba, debido a la siguiente razón (WHO, 2020b):

- Baja calidad de la muestra que contiene poco material del paciente.
- La muestra fue tomada en una fase avanzada de la enfermedad.
- La muestra no fue manipulada o enviada en las condiciones adecuadas. Implica la manipulación de la muestra para poder ser procesada, y por lo tanto una mayor probabilidad de ser contaminada (Das Mukhopadhyay et al., 2020).
- Problemas técnicos implícitos en la prueba. Elección de la enzima y su calidad, técnica del trabajador al tomar la muestra, etc. (Das Mukhopadhyay et al., 2020).

Así como también falsos positivos por error en el etiquetado o contaminación cruzada, aunque estos, son menos frecuentes.

Debido a todas estas limitaciones, el punto de mira en la actualidad es mejorar la eficacia de esta técnica, así como desarrollar nuevos métodos que impliquen un menor tiempo y una alta sensibilidad y especificidad y eviten la dependencia de instrumentación sofisticada o personal especializado.

2. OBJETIVOS

Debido a la actual situación de pandemia mundial, es necesario que todos los países se centren en estudiar las características de este virus, SARS-CoV-2, para así poder detectarlo y combatirlo. Por este motivo, el principal objetivo de este trabajo es exponer los diferentes métodos de detección que existen y que se utilizan actualmente para la detección del nuevo coronavirus SARS-CoV-2, así como informar sobre nuevos métodos que están en desarrollo para su futuro uso en la práctica clínica. Para conseguir este objetivo, se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Conocer las características del SARS-CoV-2 para así poder mejorar posteriormente el proceso de detección, incluyendo estructura viral, vía de transmisión, prevención, síntomas y tratamiento.
- Describir en detalle el método de detección más utilizado actualmente conocido como el método clásico o estándar, la qRT-PCR (*Real-time Reverse-transcription Polymerase Chain Reaction*) resaltando sus ventajas y debilidades.
- Clasificar y evaluar las distintas alternativas rápidas al método clásico, en función de lo que sean capaces de detectar: material genético (ARN viral), proteínas virales (antígenos) o bien anticuerpos, indicando también algunos de los kits comerciales que existen.
- Comparar las ventajas y las desventajas de los métodos desarrollados para establecer cuál es el más adecuado en función del estado de la enfermedad o el tiempo transcurrido.
- Explicar brevemente nuevos sistemas de detección, actualmente en desarrollo, como es el caso de los biosensores, así como los métodos basados en inteligencia artificial.

3. **METODOLOGÍA**

Para la realización de este manuscrito de revisión bibliográfica sobre métodos rápidos de detección de COVID-19, se han consultado diferentes fuentes de información incluyendo base de datos, guías clínicas, artículos científicos y páginas webs.

En el inicio de la introducción, donde se recoge mayoritariamente las características del SARS-CoV-2, la búsqueda se ha realizado en bases de datos como PubMed, Scopus o Dialnet, utilizando palabras como “Características SARS-CoV-2”, “COVID-19”, “*Structure* SARS-CoV-2”, “Vacunas SARS-CoV-2”, y “*symptoms* COVID-19”, así como también se han empleado Guías Clínicas como Fisterra. En cuanto a la parte final de la introducción, donde se explica y desarrolla el método estándar de detección del COVID-19 (qRT-PCR), se han utilizado artículos científicos buscados también en PubMed, Scopus o ScienceDirect utilizando la palabra principal “RT-PCR”, y también páginas web como *Youtube*, visualizando vídeos explicativos para una mejor comprensión de la técnica.

Para la parte de resultado y discusión, donde se desarrollan otras alternativas al método clásico y nuevos métodos aún en desarrollo, se han utilizado numerosos artículos científicos buscados en las bases de datos mencionadas anteriormente utilizando palabras como “*detection* SARS-CoV-2”, “*diagnosing* SARS-CoV-2”, “*test* COVID-19”, “*antigen-detection* SARS-CoV-2”, “*antibody* COVID-19” o “*current detection* SARS-CoV-2”. Además, en esta parte del trabajo también se han utilizado protocolos de actuación de diferentes países, así como páginas web como la WHO.

Tras la lectura del título de los artículos científicos encontrados, se hizo una primera selección de aquellos títulos que contenían la palabra “SARS-CoV-2” o “COVID-19”. Posteriormente en función del apartado a desarrollar, se procedía a la lectura del resumen para recopilar artículos que realmente fuesen de interés para el desarrollo del manuscrito. Se leyeron los artículos, subrayando las partes esenciales para el trabajo.

En cuanto a las figuras y tablas, muchas de ellas son modificadas de artículos y otras son de elaboración propia, basándose en información recogida en bases de datos mencionadas anteriormente. La Figura 5 muestra el porcentaje de contribución de cada una de las fuentes utilizadas en la elaboración de este trabajo bibliográfico.

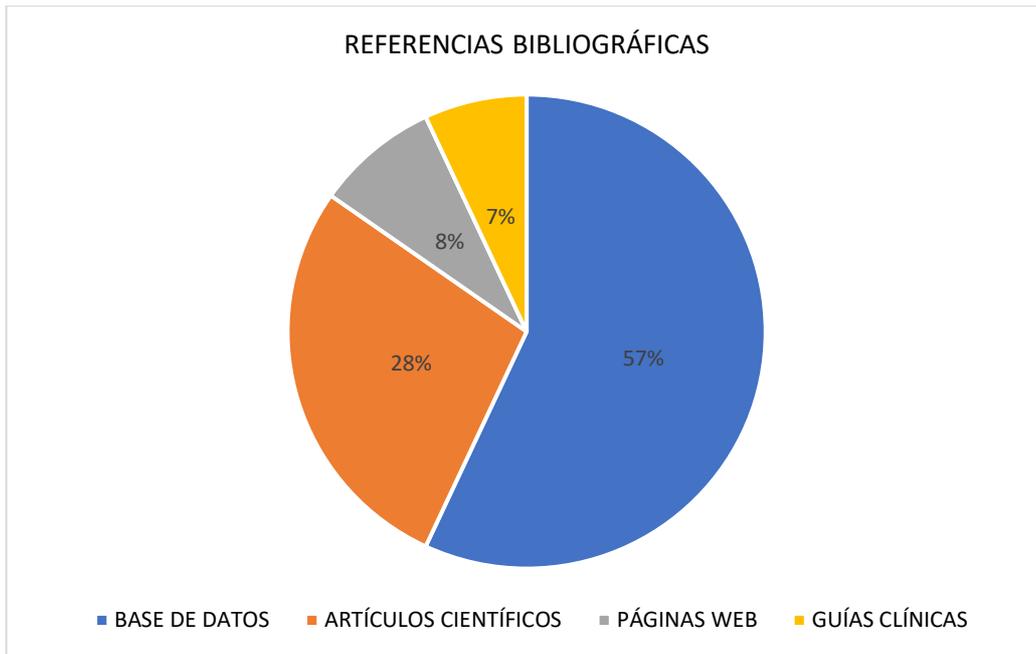


Figura 5: Porcentaje de contribución de cada una de las fuentes de búsquedas utilizada en la elaboración de este trabajo.

4. RESULTADO Y DISCUSIÓN

Esta parte del trabajo se centra en describir las distintas alternativas al método clásico que existen para detectar el SARS-CoV-2, analizando de manera crítica cada una de ellas, con sus ventajas y desventajas, así como métodos en desarrollo para su futuro uso en la práctica clínica.

4.1. MÉTODOS QUE DETECTAN ARN MONOCATENARIO DEL SARS-CoV-2

4.1.1. RT-PCR en un solo paso

Como se describe anteriormente, el método clásico se realiza en dos pasos utilizando dos tubos diferentes: en el primero se realiza el paso de ARN a ADN en un tubo, y luego la desnaturalización, hibridación y elongación en otro tubo diferente. Pero, la RT-PCR puede realizarse en un solo paso, en el que todo el proceso se realiza en un único tubo que contiene los *primers* necesarios para llevar a cabo la reacción. Aunque la RT-PCR en dos pasos tiene de manera general una mayor sensibilidad, la técnica que más se suele utilizar es la que se realiza en un solo paso, ya que es más rápida de preparar y disminuye la posible contaminación que pueda producirse al manipular la muestra del paso de RT a PCR (Carter et al., 2020). Un ejemplo de este tipo de test realizado en un solo paso es el *OSN-qRT-PCR*, el cual tiene una buena sensibilidad, lo que permite detectar muestras con baja carga viral (Wang et al., 2020). Según el estudio realizado por Wang et al., se comparó este test con uno de los kit comerciales de qRT-

PCR obteniéndose una sensibilidad del 100% y una especificidad del 91% (Tabla 4) (Wang et al., 2020).

4.1.2. RT- LAMP (*Reverse-transcription Loop-mediated isothermal amplification*)

Otra de las alternativas propuestas dentro de los métodos moleculares para intentar suplir las deficiencias del método clásico es a través de la amplificación isotérmica mediada por bucle junto con la transcriptasa inversa. Se trata de una técnica molecular que se basa en la amplificación del ácido nucleico, utilizando una ADN polimerasa con una alta actividad de desplazamiento de hebra (Yuan et al., 2020), y un grupo de cuatro a seis cebadores ("*primers*"), los cuáles se sintetizan de manera específica y exclusiva para ésta técnica ya que tienen una sensibilidad extremadamente alta para reconocer un total de seis secuencias diferentes de ADN viral en condiciones isotérmicas (Huang et al., 2020). Al igual que ocurre con la PCR, es posible combinar la técnica LAMP con la transcripción inversa en una única reacción (RT-LAMP) (Instituto Nacional de Salud, 2020) para así poder detectar el ARN viral y convertirlo en ADNc (Chan et al., 2021).

El proceso es similar al de PCR, con la diferencia de que la amplificación de ADN se puede llevar a cabo a una temperatura constante de 60-65°C sin la necesidad de utilizar un termociclador (Martín et al., 2021). Permite realizar $10^9 - 10^{10}$ amplificaciones en unos 15-60 minutos. Por otro lado, la detección de los productos obtenidos se realiza a través de electroforesis con gel de agarosa o monitorizando el proceso en tiempo real a través de la medida de señal de fluorescencia, la turbidez o por colorimetría (Yuan et al., 2020).

En cuanto a la sensibilidad y eficacia de este método, está relacionado con el tipo de *primers* que se utilice. En un estudio realizados a 213 pacientes sanos y 47 pacientes positivos en COVID-19, se utilizaron varios *primers* diferentes dirigidos a los genes que codifican las proteínas ORF1ab, la proteína E y la proteína N, dando como resultado una sensibilidad del 91,4% y una especificidad del 99,5% (Xu et al., 2020) como se muestra en la Tabla 4. Por otro lado, en el caso del método iLACO, basado en RT-LAMP, se utilizó como *primers* aquellos que van dirigidos al gen que codifica únicamente la proteína ORF1ab. Se llevó a cabo un estudio con 248 pacientes positivos obteniéndose una sensibilidad del 89,9% (Yu et al., 2020) (Tabla 4). Por último, mencionar una variante de RT-LAMP desarrollada para mejorar su sensibilidad conocida como *Mismatch-tolerant technique* RT-LAMP, la cual se diferencia de la RT-LAMP convencional en que en esta se utilizan ADN polimerasas conocidas como ADN polimerasas de alta-fidelidad. En un estudio llevado a cabo por Lu et al., se tomaron 24 muestras, de las cuales 17 se clasificaron como positivas tanto por RT-PCR como utilizando esta técnica, demostrando así un 100% de sensibilidad y especificidad (Lu et al., 2020) (Tabla 4). Por otro lado, actualmente, el único test

basado en esta técnica disponible para realizar en el domicilio de manera autónoma es el kit comercial “Lucira”, que fue aprobado por la FDA en Noviembre de 2020 (Martín Alonso et al., 2020).

4.1.3. CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*)

Por último, dentro de las técnicas moleculares también encontramos el método CRISPR. Se trata de una técnica molecular que recoge a una familia de secuencias de ácidos nucleicos las cuales se encuentran en organismos procariontes como son las bacterias. De manera que estas secuencias son reconocidas por unas enzimas nucleasas bacterianas específicas de esta técnica como son Cas9, Cas12 y Cas13 (Carter et al., 2020).

Actualmente, existen dos métodos en desarrollo, entre otros, para utilizar en la detección de SARS-CoV-2. Por un lado, el método SHERLOCK (*Specific High Sensitivity Enzymatic Reporter Unlocking*), que utiliza la enzima Cas13, la cuál es capaz de reconocer y cortar secuencias específicas de ARN al ser activada por una pequeña guía de ARN del virus complementaria al ARN que se quiere cortar. El método SHERLOCK tradicional se realiza en dos pasos: primero una amplificación del ARN a través de una reacción isotérmica (LAMP), seguido del método CRISPR utilizando la enzima Cas13. Sin embargo, el avance y dónde está puesto el foco es en una variante de éste método conocida como STOPCovid o SHERLOCK en un solo paso, pero en este caso no se utiliza la enzima Cas 13 ya que ésta solo detecta moléculas de ARN (Feng et al., 2020), si no que se utiliza la enzima Cas12b y reconoce la proteína viral N (Pang et al., 2020). Esta variante permite reducir de manera significativa una posible contaminación de la muestra, se puede realizar a una temperatura constante, no requiere extracción de la muestra y permite observar el resultado de manera visible y sencilla (Joung et al., 2020).

Por otro lado, el método DETECTR (*DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter*), utiliza la enzima Cas12 para detectar de manera específica las proteínas E y N del ARN viral, seguido de una amplificación isotérmica (LAMP) y finalmente visualizando el resultado a través de fluorescencia (Carter et al., 2020). DETECTR es más rápido que la RT-PCR (unos 45 minutos), pero menos sensible. SHERLOCK dura aproximadamente 1 hora (Das Mukhopadhyay et al., 2020). La diferencia principal entre DETECTR y SHERLOCK es que ésta última puede procesar la muestra de ARN de manera directa, a diferencia de DETECTR que necesita una etapa previa de transformación de ARN a ADN (Broughton et al., 2020).

En cuanto a la sensibilidad y especificidad, un estudio realizado en 36 pacientes con COVID-19 y 42 pacientes con otras patologías respiratorias muestra que DETECTR presenta un 95% de sensibilidad y un 100% de especificidad, mientras que en estudios que se hicieron para STOPCovid donde se utilizaron 12 muestras de pacientes COVID positivos y 5 de pacientes

negativos, los resultados fueron de un 97% de sensibilidad y 100% especificidad (Shang et al., 2020) como muestra la Tabla 4. En este momento solo se ha aprobado por la FDA un solo kit basado en el sistema Sherlock CRISPR SARS-CoV-2 kit (Martín Alonso et al., 2020).

Tabla 4. Comparativa de la sensibilidad y especificidad de los distintos métodos moleculares para detectar el SARS-CoV-2.

TÉCNICA EMPLEADA	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
RT-PCR en un solo paso		
<i>OSN-qRT-PCR</i>	100%	91%
RT-LAMP		
<i>RT-LAMP (con varios primers dirigidos a ORF1ab, E, N)</i>	91,4%	99,5%
<i>iLACO (primer dirigido a ORF1ab)</i>	88,9%	99%
<i>Mismatch-tolerant RT-LAMP</i>	100%	100%
CRISPR		
<i>DETECTR (Cas12)</i>	95%	100%
<i>STOPCovid (Cas12b)</i>	97%	100%

Nota. Sensibilidad: probabilidad de que un resultado sea positivo cuando está presente la enfermedad. $S = (\text{verdaderos positivos}) / (\text{verdaderos positivos} + \text{falsos negativos}) * 100$. Especificidad: probabilidad de que un resultado sea negativo cuando la enfermedad no existe. $E = (\text{verdaderos negativos}) / (\text{verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}) * 100$ (Böger Msc et al., 2021)

4.2. MÉTODOS QUE DETECTAN ANTÍGENOS VIRALES

Además de los métodos moleculares, existen otros métodos para poder detectar el SARS-CoV-2, como a través de pruebas de diagnóstico rápidas (RDT) que, en lugar de detectar el ARN viral, detectan la presencia de proteínas virales (antígenos) en unos 10-30 minutos aproximadamente (Carter et al., 2020). Normalmente detectan la nucleoproteína N o la proteína S ya que se encuentran en mayor abundancia. La mayoría de estas pruebas son ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral (LFIA), que son pruebas cualitativas (WHO, 2020b).

En este caso las muestras que se toman son las mismas que para la qRT-PCR, se toman del tracto respiratorio. No se recomienda utilizar VTM durante su almacenamiento y transporte porque puede disminuir la sensibilidad de la prueba. También deben ser procesadas en laboratorios BSL-2 (WHO, 2020c). El sistema de detección de estas pruebas consiste en utilizar un indicador fluorescente o colorimétrico, como por ejemplo oro coloidal, lo que permite que

se pueda visualizar el resultado. Una vez tomada la muestra, se introduce en el tubo de extracción dónde se encuentra una solución que contiene los anticuerpos marcados con oro coloidal, de manera que, si la muestra tiene proteínas virales se van a unir a estos anticuerpos formando un complejo antígeno-anticuerpo (Instituto de Guatemalteco de Seguridad, 2020). A continuación, añadimos unas gotas de esta dilución en el soporte de plástico, el cuál tiene dos orificios, uno para la muestra y otro para la solución tampón, y en su interior una tira que normalmente es una membrana de nitrocelulosa. Estos complejos van avanzando por la tira por capilaridad hasta alcanzar lo que se conoce como la línea de prueba, la cuál contiene anticuerpos específicos virales inmovilizados. Por lo que, si la muestra contiene antígenos del virus, se unirá a estos anticuerpos formando un “sándwich” (anticuerpo marcado con fluorescencia-antígeno-anticuerpo) y la línea de prueba cambiará de color indicando que el resultado es positivo. En el caso de que no cambie de color, el resultado será negativo. Sin embargo, una vez que llega aquí, la muestra sigue avanzando por la tira hasta llegar a lo que se conoce como línea de control. Esta línea contiene anticuerpos marcados que se unen a otros antígenos de la muestra, como por ejemplo puede ser el antígeno del estreptococo C (microbiota de la faringe). Esta prueba solo se considera válida cuando la línea de control cambia de color. En el caso de que una de las dos líneas no cambie de color, se considerará no válida cuando no cambie de color la línea de control, o negativa cuando no cambie de color la línea de prueba. Es importante mencionar que cada kit trae sus propias instrucciones, las cuales hay que seguir rigurosamente para interpretar los resultados, así como para saber el tiempo necesario que debe transcurrir para leer correctamente los resultados (Martín et al., 2021). La Figura 5 muestra un esquema de todas las etapas del proceso.



Figura 6: Proceso esquemático del test rápido de antígenos para detectar SARS-CoV-2.

Un ejemplo de estos tests rápidos de antígenos es el *Standard Q COVID-19 Ag test* que en concreto sirve para detectar la proteína N. En el estudio realizado por Chaimayo et al. en el que

se compara la tasa de positivos y negativos de este test con unos de los ensayos que existe basados en la RT-PCR (*Allplex 2019-nCov Assay*), utilizando un total de 454 muestras, se obtiene que el test rápido tiene un 98,33% de sensibilidad y un 98,73% de especificidad (Chaimayo et al., 2020).

Sin embargo, la sensibilidad de estas pruebas, en comparación con la qRT-PCR, parece ser muy variable (0-94%) en función del tipo de kit comercial, aunque la especificidad se mantiene bastante alta (> 97%). Para que puedan funcionar correctamente como mínimo deben tener una sensibilidad $\geq 80\%$ y una especificidad $\geq 97-100\%$. Es por esto, por lo que esta prueba se recomienda principalmente en aquellos pacientes que tienen una alta carga viral ($Ct < 25$) que corresponde al inicio de la enfermedad (1-3 días antes de aparecer los síntomas o en los primeros 5-7 días de la enfermedad), ya que a medida que pasen los días, la carga viral va disminuyendo y cabe la posibilidad de que aparezcan falsos negativos. La OMS recomienda utilizar estas pruebas cuando la qRT-PCR no esté disponible o cuando, debido a la saturación de pacientes, el procedimiento de la qRT-PCR se vea muy prolongado en el tiempo y por lo tanto impide o disminuye la utilidad clínica de la prueba (WHO, 2020c).

Además de estos tests descritos, también existen test de antígenos cuantitativos como, por ejemplo, "*LUMIPULSE SARS-CoV-2 Ag kit*" el cual está basado en "*CLEIA*" (Inmunoensayo enzimático por quimioluminiscencia). Es decir, muestran la cantidad de antígenos presentes en el momento del análisis. Esto permite distinguir entre fases tempranas o tardías de la enfermedad (Hirotsu et al., 2020).

4.3. MÉTODOS QUE DETECTAN ANTICUERPOS

Actualmente, otra alternativa a la RT-PCR son los ensayos serológicos los cuáles detectan la presencia de anticuerpos (inmunoglobulinas) en sangre producidas por el organismo humano a causa de la infección producida por el SARS-CoV-2. Por lo que, estos ensayos no nos informan sobre si existe una infección en ese momento, si no que nos dan una idea sobre la cantidad de población que ya ha pasado la infección, y por lo tanto de la cantidad de población que está inmunizada (Martín et al., 2021). Podemos encontrar ensayos semi-cuantitativos/cualitativos como el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o inmunoensayo enzimático de quimioluminiscencia (CLIA), en los que podemos medir la cantidad de anticuerpos generados, y ensayos no cuantitativos en los que simplemente se puede saber si tienes o no anticuerpos, como es el caso de los ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral (LFIA) (WHO, 2020d).

Pueden detectar inmunoglobulinas totales o específicos (Ig M, Ig G o IgA). La IgM es la primera en aparecer durante la fase aguda de la enfermedad y decae cuando va disminuyendo la carga viral (Gestoso-Pecellín et al., 2020), sin embargo, según la Sociedad Española de

Inmunología no se acumulan suficientes IgM hasta los 2-4 días tras aparecer los síntomas de la enfermedad por lo que no es eficaz en la fase asintomática de la infección. Posteriormente aparece la IgG la cual se comienza a acumular de manera abundante a partir de los 15 días y que sí perdura en el tiempo (Bautista Moreno et al., 2020). Estos métodos no están indicados en la fase aguda de la enfermedad, si no tras la tercera o cuarta semana después de la aparición de los síntomas, momento en el cuál suelen producirse los niveles máximos de anticuerpos (WHO, 2020c). La Figura 6 muestra la evolución de ambas inmunoglobulinas a lo largo del tiempo.

Antes de comenzar a describir los distintos tipos de ensayos serológicos que hay, es importante resaltar que la ausencia o bajada de los niveles de anticuerpos no está relacionado con no adquirir la inmunidad, ya que se puede generar lo que se conoce como memoria inmunitaria con linfocitos T (celular) y B (humoral), los cuáles también responden y nos protegen frente a futuras exposiciones del virus (Martín Alonso et al., 2020).

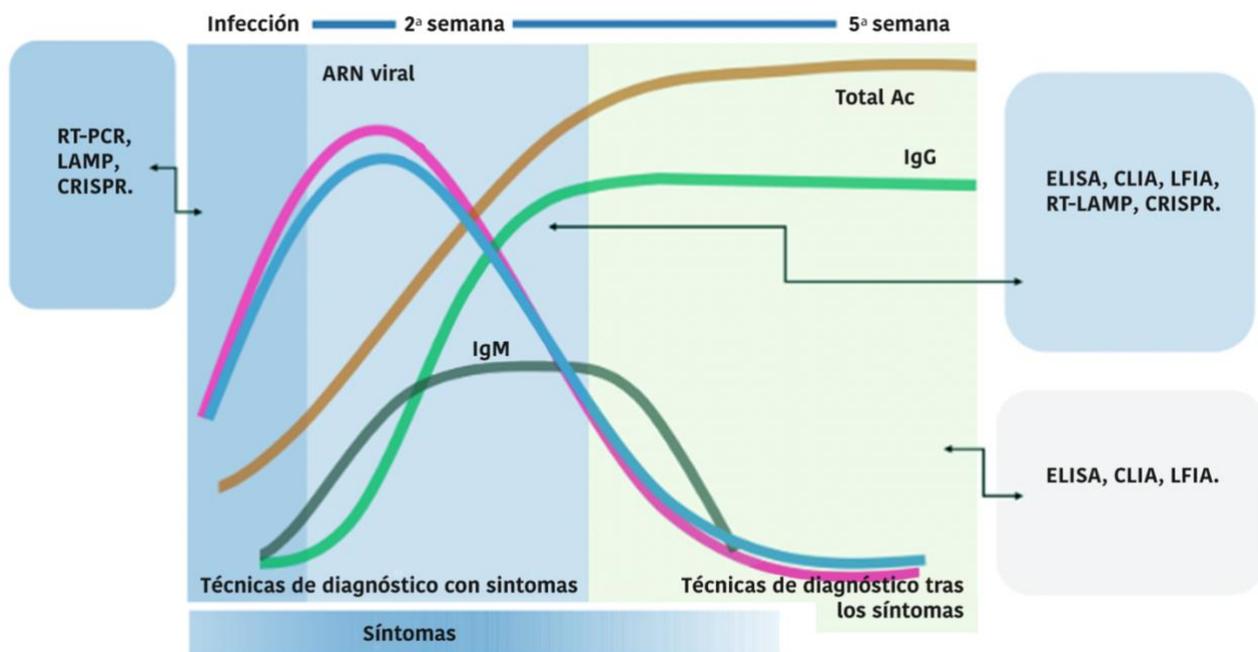


Figura 7: Curvas esquemáticas de los niveles de los distintos anticuerpos en sangre, así como el método de detección que se debe utilizar en cada etapa de la enfermedad (Mattioli et al., 2020).

En general, en los ensayos redactados a continuación, las muestras que se pueden utilizar son orina, saliva, sudor, suero, plasma u otros fluidos, aunque lo más frecuente es que se utilice sangre total (Xu et al., 2020).

4.3.1. Ensayo inmunocromatográfico de flujo lateral (LFIA).

Se trata de un proceso similar al test rápido de antígenos. Consiste en un soporte de plástico que contiene una tira, normalmente es una membrana de nitrocelulosa, en la cuál se inmovilizan los antígenos del SARS-CoV-2 (Xu et al., 2020). Este antígeno normalmente suele ser la proteína S o N, pero depende del tipo de test que se utilice (Martín et al., 2021). La muestra se añade en un extremo de la tira donde se encuentran anticuerpos marcados con fluorescencia, como oro coloidal, o bien con puntos cuánticos. De manera que, la muestra y estos anticuerpos marcados migran a lo largo de la tira por capilaridad. Así, si la muestra contiene anticuerpos del SARS-CoV-2, se unirá al anticuerpo de detección marcado y ambos a su vez al antígeno inmovilizado dando lugar a la aparición de banda de color en la tira, que significa que el resultado es positivo. En este caso se forma un sándwich de anticuerpo marcado con fluorescencia-anticuerpo de la muestra-antígeno inmovilizado. De igual manera, también tienen una línea de control, la cual tiene que ser coloreada para que el resultado se considere válido. El resultado se obtiene en unos 5-30 minutos (Xu et al., 2020). La Figura 7 muestra el proceso descrito anteriormente de manera esquemática.

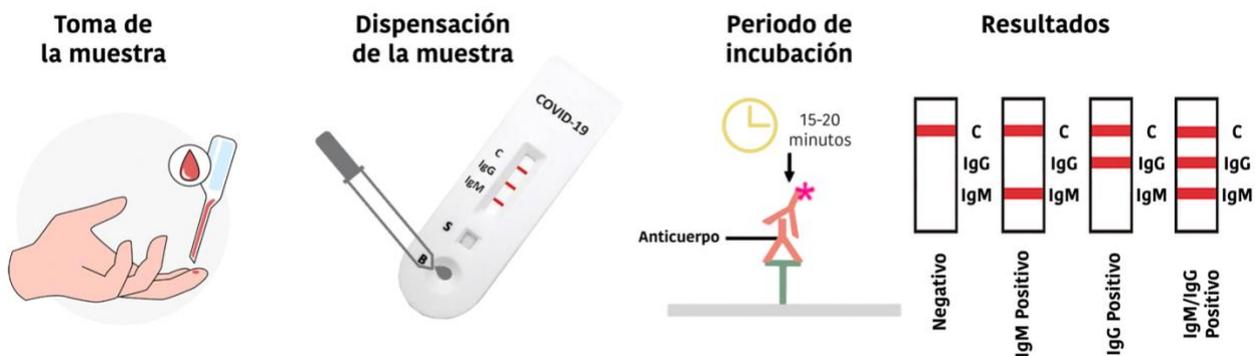


Figura 8: Proceso esquemático de la detección de anticuerpos contra el SARS-CoV-2 a través de LFIA.

Para medir la sensibilidad y especificidad de este tipo de test, así como del resto de pruebas serológicas en general, es muy importante el tiempo que ha transcurrido desde la detección de los síntomas. Así, en el caso de LFIA para detectar IgM/IgG se ha demostrado que, durante los 7 primeros días desde el inicio de los síntomas, estos test tienen una sensibilidad del 18,8% y una especificidad del 77,8%, a los 8-15 días presentan una sensibilidad del 100% y una especificidad del 50%, y a partir de los 16 días tienen una sensibilidad del 100% y una especificidad del 64,3%, de manera general. Esto puede variar en función del kit y antígeno utilizado (Ejazi et al., 2021). Un ejemplo de este tipo de pruebas es el kit *WANTAI SARS-CoV-2 Ab Rapid Test*, el cual utiliza

como antígeno la proteína RBD. Según los estudios, a este test se le ha determinado una sensibilidad del 97,5% y una especificidad del 95,2%. Aunque, también se va ha visto que estos datos pueden variar en función de la muestra (Rusling y Liu, 2021).

Aunque, si comparamos la sensibilidad de ELISA y CLIA con los test LFIA, estos últimos tienen una sensibilidad menor. Sin embargo, están en el punto de mira por su facilidad de uso, así como su rapidez de diagnóstico. De hecho, un estudio reciente muestra que los test LFIA que utilizan los antígenos S son más sensibles que los que utilizan el antígeno N (Martín et al., 2021).

4.3.2. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Consiste en fijar los antígenos del SARS-CoV-2 en un sustrato sólido como puede ser una placa de pocillos, y a continuación añadir una solución que contenga el anticuerpo específico. De esta manera se produce la unión entre ambos. Además, para poder detectar esta unión se añade un segundo anticuerpo marcado, en este caso con una enzima, y se incuba. Tras la incubación, se lava y se añade un sustrato específico para la enzima que va conjugada con el anticuerpo, de manera que cuando la enzima cataliza el sustrato, se produce un cambio de color. A través de un lector de placas podemos detectar si se ha producido esta unión o no (Xu et al., 2020).

La sensibilidad y especificidad de este método está muy ligado con el tipo de proteína viral que se utilice. En China, se realizó un estudio para medir los anticuerpos generados frente a la proteína N, obteniendo un 81,5% de sensibilidad. En otro estudio similar, se puede observar también que para la proteína S, ELISA tiene una sensibilidad del 85% y un 100% de especificidad, aumentando la sensibilidad de la IgG a medida que va transcurriendo la enfermedad (Ejazi et al., 2021). Actualmente está en desarrollo una variante de ELISA en papel. Esto permite poder detectar el resultado de manera visual a través de un cambio de color, lo que facilita el diagnóstico. Esta prueba está basada en detectar anticuerpos IgG frente a la proteína viral N. Consiste en un papel de cromatografía intercalado con finas láminas con agujeros. A continuación, se cubre la superficie con el antígeno N y se añade la muestra que contiene estos anticuerpos específicos. Posteriormente se añade peroxidasa de rábano (HRP) conjugada con IgG humana y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina para poder visualizar el resultado. Al ser una prueba económica y que permite tener un resultado en 30 minutos, es de bastante interés para un uso en un futuro (Rusling y Liu, 2021).

4.3.3. Inmunoensayo enzimático de quimioluminiscencia (CLIA)

En el caso de CLIA, se procede de igual manera que con ELISA, pero la unión antígeno-anticuerpo se detecta con un anticuerpo marcado con una enzima la cuál cataliza otro sustrato

diferente al de ELISA. Es decir, en el caso de ELISA, el sustrato que cataliza la enzima es TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) y para CLIA el sustrato catalizado es luminol. Es por eso por lo que, en lugar de cambiar de color, produce luminiscencia, como se puede observar claramente en la Figura 8. CLIA tiene mayor sensibilidad que ELISA y está automatizado por completo, lo que permite analizar muchas muestras de manera sencilla en un solo día (Xu et al., 2020).

Un estudio realizado en China muestra una sensibilidad del 97,7% y una especificidad del 95,2% en la detección de IgG a través de CLIA, y una sensibilidad del 95,6% y una especificidad del 96,6% en el caso de la IgM. Por otro lado, en estudios en los que se ha evaluado la detección de ambas inmunoglobulinas en total, parece ser que disminuye un poco la sensibilidad y aumenta la especificidad, siendo de un 92% y 99,3% respectivamente. Por último, un estudio realizado por Liu et al. en Wuhan compara los test de anticuerpos con las pruebas moleculares, en este caso la RT-PCR, en los diferentes estados de la enfermedad obteniendo los resultados de sensibilidad mostrados en la Tabla 5 (Ejazi et al., 2021).

Tabla 5: Comparación de la sensibilidad entre RT-PCR y CLIA en función de la severidad de la enfermedad (Ejazi et al., 2021).

	Casos moderados		Casos severos		Casos críticos	
	RT-PCR	CLIA	RT-PCR	CLIA	RT-PCR	CLIA
IgM	65,91%	79,55%	71,15%	82,69%	67,57%	72,97%
IgG		83,18%		100%		97,30%

Una variante de CLIA sería MCLIA o inmunoensayo basado en partículas magnéticas de quimioluminiscencia. En concreto el ensayo *Abbott SARS-CoV-2 IgG* que sirve para detectar IgG en suero o plasma, utilizando la proteína viral N. Tiene un mecanismo similar a CLIA, pero en este caso los antígenos utilizados están envueltos por micropartículas paramagnéticas las cuáles van a atraer a los anticuerpos marcados con acridino formando el complejo antígeno-anticuerpo. Aunque según el estudio realizado, tiene una menor sensibilidad (Rusling y Liu, 2021).

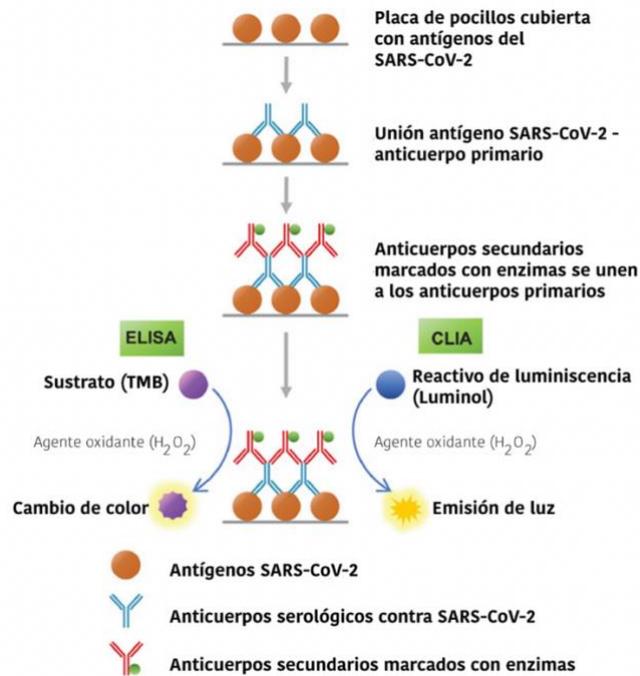


Figura 8: Representación del proceso de ELISA y CLIA. Modificada de (Xu et al., 2020)

4.4. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL SARS-CoV-2

En este apartado se introduce una tabla comparativa (Tabla 6) de los distintos métodos descritos anteriormente, mostrando las ventajas y desventajas de estos. Esto resulta de gran interés sobre todo para saber qué tipo de método es mejor utilizar en cada momento de la enfermedad, así como dónde lo queremos utilizar (en domicilio, hospital, etcétera) teniendo en cuenta también el coste y las dificultades para poder llevar a cabo la prueba.

Tabla 6: Ventajas y desventajas e inconvenientes de los distintos métodos de detección del SARS-CoV-2. (Gestoso-Pecellín et al., 2020), (Instituto Nacional de Salud, 2020), (Martín et al., 2021), (Martín Alonso et al., 2020), (Xu et al., 2020).

TÉCNICA DE DETECCIÓN	VENTAJAS	INCONVENIENTES
RT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> - Alta especificidad y sensibilidad - Prueba segura y eficaz - Permite detectar la enfermedad en pacientes sintomáticos y asintomáticos 	<ul style="list-style-type: none"> - Laboratorio BLS 2 - Caro - Personal formado - Instrumentación compleja - Tiempo: 3-4 horas

RT-LAMP	<ul style="list-style-type: none"> - No necesita termociclador - Se puede realizar a una temperatura constante - Más rápido que la PCR: 30-45 minutos. - Alta especificidad 	<ul style="list-style-type: none"> - Menos sensible - Bajo rendimiento: solo se puede analizar una muestra por proceso - No es una técnica cuantitativa
CRISPR	<ul style="list-style-type: none"> - Duración de 45 – 60 minutos - Más económica 	<ul style="list-style-type: none"> - Equipamiento específico - Personal entrenado
Test de antígenos de flujo lateral	<ul style="list-style-type: none"> - Más sencillos de realizar y no necesitan equipos sofisticados ni personal cualificado - Rápido (30 minutos aprox.) y barato 	<ul style="list-style-type: none"> - Menos sensibilidad que la RT-PCR - Falsos negativos
Test de anticuerpos de flujo lateral	<ul style="list-style-type: none"> - Fácil uso - No se necesita personal especializado. - Resultados en 10-15 minutos. 	<ul style="list-style-type: none"> - No se puede cuantificar ni diferenciar el tipo de inmunoglobulina.
Test de anticuerpos por ELISA	<ul style="list-style-type: none"> - Se puede cuantificar y diferenciar el tipo de inmunoglobulina - Fácil manejo - Bajo coste - Alto rendimiento 	<ul style="list-style-type: none"> - Se necesita personal especializado. - Puede tardar horas o días
Test de anticuerpos CLIA	<ul style="list-style-type: none"> - Se puede cuantificar y diferenciar el tipo de inmunoglobulina - Fácil manejo - Bajo coste - Resultados en unos 30 minutos - Proceso automatizado 	<ul style="list-style-type: none"> - Se necesita personal especializado

4.5. OTROS MÉTODOS ALTERNATIVOS EN DESARROLLO

Además de los métodos presentados y comparados anteriormente, existen muchos otros que están en desarrollo ya que debido a la situación actual de pandemia es necesario seguir investigando y descubrir nuevos métodos que nos permitan detectar la enfermedad lo antes posible y con la mayor seguridad. En este apartado, se describen los biosensores, que están en el punto de mira como la mejor alternativa para salvar los inconvenientes de los métodos anteriores.

En primer lugar, los biosensores son dispositivos capaces de transformar un comportamiento biológico en una señal analítica medible (Mattioli et al., 2020). En este caso, los métodos para detectar el SARS-CoV-2 basados en biosensores detectan interacciones de afinidad, distinguiendo así cuatro grupos que se describen a continuación. Estos métodos están en el punto de mira gracias a que tiene numerosas ventajas como fácil instrumentación y manejo, rapidez en los resultados, así como la no necesidad de ningún tratamiento previo de la muestra (Das Mukhopadhyay et al., 2020). La Figura 9 muestra las características que debería tener y que se intenta buscar y desarrollar para que un biosensor sea ideal.



Figura 9: Características de un biosensor ideal. Modificada de (Bhalla et al., 2020).

Los inmunosensores son biosensores que se basan en las interacciones antígeno-anticuerpo. Se utiliza lo que se conoce como aptámeros (secuencias peptídicas compuestas por unas 40-60 bases tanto de ADN como ARN) que simulan la función de los anticuerpos ya que se manipula su estructura para que contengan sitios de unión específicos con los antígenos.

Cuando se produce esta interacción, se genera una señal la cuál se puede cuantificar. Otro tipo de biosensor es aquel basado en sondas antigénicas que detecta antígenos de superficie como es la proteína viral de la nucleocápside (N) o de la envoltura (E) a través de la utilización de anticuerpos específicos para estos antígenos, extraídos de sueros de pacientes enfermos. Por otro lado, los biosensores de ADN (genosensores) se basan en la hibridación de los ácidos nucleicos destacando en concreto el uso de los ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) por ser muy estables. Por último, los biosensores celulares que están basados en los efectos citopáticos (CPEs) que genera el SARS-CoV-2 como puede ser la degradación de la membrana o los cambios morfológicos degenerativos, es decir, el biosensor detecta estos CPEs y emite una señal cuantitativa que se puede detectar a través de señales ópticas, resistencia electroquímica o conductabilidad (Das Mukhopadhyay et al., 2020). En caso de los inmunosensores y genosensores se ha desarrollado lo que se conoce como biodispositivos a base de celulosa (PBBs), es decir tiras de celulosa en las que se inmovilizan enzimas, anticuerpos o aptámeros y a través de reactivos se puede observar el resultado por colorimetría, fluorescencia o bien con espectroscopía. Se trata de un método sencillo, rápido y sin apenas instrumentación, sin embargo, aún tiene ciertos inconvenientes, sobre todo, para ser utilizados de manera masiva ya que no es una técnica que se pueda llevar a cabo de manera automatizada (Mattioli et al., 2020)

Además de estos tipos de biosensores basados en distintas interacciones, existen otros como los biosensores plasmónicos, los cuales suponen un gran avance en detección del SARS-CoV-2. Estos son capaces de detectar y cuantificar las partículas virales que hay en el aire a través de un biosensor de resonancia plasmónica superficial localizada (LSPR) basado en nanoislas de oro acompañadas con succinimidil-éster (SEF-AuNIs). Este biosensor tiene una alta sensibilidad lo que permite detectar partículas muy pequeñas hasta de 0,22 pM (Das Mukhopadhyay et al., 2020). Tiene la ventaja de que supone un bajo coste, sin embargo aún hay que superar la dificultad para preparar los diferentes sustratos (Mattioli et al., 2020).

Por otro lado, también están los biosensores bioeléctricos que sirven para detectar la proteína viral S y permite poder realizar un seguimiento continuo de los pacientes, siendo más relevante para aquellos asintomáticos. Este biosensor reconoce los cambios bioeléctricos que se producen en las membranas de las células Vero de mamíferos que contienen los anticuerpos humanos desarrollados en contra de la proteína S. Es decir, al producirse la unión antígeno-anticuerpo, se produce un cambio bioeléctrico en la membrana y se produce una señal detectable. Tiene la gran ventaja de que podría dar un resultado en tan solo 3 minutos.

Por último, encontramos los biosensores basados en FET de grafeno (transistor de efecto de campo de grafeno). Sería una combinación entre un inmunosensor junto con grafeno, de manera que éste funciona como canal y el fluido corporal como puerta líquida. El grafeno se une

de manera no covalente a los receptores ACE2 o bien con los anticuerpos específicos para la proteína S. Así, cuando el antígeno S se une bien al anticuerpo o al receptor se produce un cambio en la conductibilidad del FET detectable. El inconveniente de este biosensor es su alto coste y bajo rendimiento (Das Mukhopadhyay et al., 2020).

4.6. MÉTODOS DIGITALES BASADOS EN INTELIGENCIA ARTIFICIAL

Los métodos digitales basados en inteligencia artificial (IA) pueden ayudar de manera muy efectiva en la actual pandemia, ya que permite tener un mayor control de la propagación del virus al poder registrar los datos en bases de datos, así como desarrollar métodos de detección a través de IA absolutamente revolucionarios. Además, también es útil para disminuir la carga de trabajo al personal sanitario y disminuir la saturación de los centros sanitarios.

Por un lado, el Centro de Ciencia e Ingeniería de Sistemas de la Universidad Johns Hopkins ha desarrollado, entre otros, una aplicación para los móviles donde los pacientes pueden anotar los síntomas y signos que tienen, si han estado en contacto con personas positivas en COVID-19, si han viajado recientemente a zonas expuestas al virus, etc. De esta manera, toda esta información está a disposición del médico para valorar qué casos son sospechosos de COVID-19 y cuáles no (Adly et al., 2020).

Por otro lado, uno de los principales problemas de la propagación del virus es incumplir la cuarentena establecida, por lo que otra aplicación de la IA sería poder monitorizar a los pacientes en cuarentena a través de sus móviles o pulseras inteligentes. Así, si salieran de casa sonaría una alarma advirtiendo de que el paciente está rompiendo la cuarentena. Además de monitorizar a los pacientes con este fin, también sería de gran eficacia desarrollar un sistema de monitorización de alta velocidad para pacientes que padezcan la enfermedad, basado en imágenes de videos, utilizando algoritmos de seguimiento del movimiento, ya que pueden proporcionar información como la temperatura corporal, frecuencia cardíaca, presión arterial, saturación de oxígeno y frecuencia respiratoria, lo que puede proporcionar una idea del estado y la gravedad del paciente, las patologías que presenta y el posible alta hospitalario de éste. De esta manera, todo este proceso de monitorización del paciente se podría automatizar total o parcialmente, disminuyendo el riesgo de infección así como la carga de trabajo al personal sanitario, además de poder actuar de manera más rápida y eficaz en función de los parámetros del paciente (Adly et al., 2020).

Un estudio realizado por Mishra et al., utiliza los relojes inteligentes o *smarwatch* para monitorizar la frecuencia cardíaca en reposo, la relación frecuencia cardíaca en movimiento (pasos) y el sueño para detectar la enfermedad, ya que estos parámetros están asociados a COVID-19. Se observó que se producía un aumento de estos parámetros sobre todo justo antes

de aparecer los síntomas. Incluso se ha observado que episodios de estrés en los que se produce un aumento de la frecuencia cardíaca sostenido, pueden aumentar la susceptibilidad de contagiarse de SARS-CoV-2 al exponerse a éste. Esto es de gran interés sobre todo en las personas asintomáticas ya que, si aparentemente no presenta síntomas visibles, a través de la monitorización de estos parámetros podría autoaislarse o bien consultar a su médico. Una de las limitaciones del *smartwatch* es la batería de estos, ya que durante el tiempo de carga se pierden datos. Además, aún no se ha observado con claridad si es capaz de distinguir la COVID-19 con otras enfermedades virales que puedan tener parámetros similares. Todo esto aún está en desarrollo, esperando incluir nuevos parámetros, como las frecuencias respiratorias o el oxígeno en sangre, que puedan identificar la enfermedad (Mishra et al., 2020).

Por último, otro estudio realizado por Quatieri et al., consiste en utilizar grabaciones de voz simulando una tos forzada con móviles que tengan IA. Para ello, se ha creado un marco de procesamiento de habla que utiliza unos biomarcadores acústicos capaces de transformar el sonido de las grabaciones en una estructura de redes neuronales basada en la articulación, respiración y fonación. Es decir, al contraer la enfermedad se produce una inflamación del tracto respiratorio inferior que modifica estos tres parámetros y eso es lo que recogen esos biomarcadores acústicos para detectar el virus. Al igual que el estudio anterior, es de especial relevancia en pacientes asintomáticos, ya que son los que tienen mayor tasa de propagación al no poder identificar que padecen la enfermedad y aislarlos (Quatieri et al., 2020).

5. CONCLUSIONES

- La técnica más empleada hoy en día por ser segura y eficaz es el método clásico qRT-PCR, pero tiene algunos inconvenientes, como es el tiempo que tarda en procesarse la muestra, que ha hecho que se tengan que desarrollar otras técnicas como son RT-PCR en un solo paso, RT-LAMP y CRISPR, que detectan ARN viral, test rápido de antígenos, que detectan proteínas virales, y pruebas serológicas que detectan anticuerpos.
- Los parámetros de calidad para evaluar los métodos analíticos propuestos son la sensibilidad y especificidad de la técnica, así como el tiempo que se tarda en obtener los resultados. Por lo tanto, el objetivo de los métodos de detección es obtener resultados fiables y rápidos con la finalidad de detener la propagación del virus.
- La importancia de que los resultados sean cualitativos o cuantitativos dependerá de la finalidad con la que se quiera utilizar la técnica. Si lo que se pretende es hacer un cribado masivo de la población, será suficiente con hacer tests rápidos de antígenos. Por otro lado, si lo que se desea es saber la carga viral o el estado de la enfermedad sería necesario realizar la qRT-PCR o un test de antígeno cuantitativo, y si se desea saber si se ha pasado la enfermedad una prueba serológica de anticuerpos. Por lo tanto, hay que valorar que técnica es preferible utilizar en cada ocasión en función de la finalidad de esta.
- Por último, la detección del virus a través de biosensores es una alternativa aún en desarrollo, pero que tiene altas expectativas gracias a su mecanismo de acción. De igual manera, utilizar la inteligencia artificial puede suponer un gran avance en la evolución de la pandemia, no solo por la creación de métodos absolutamente revolucionarios, si no también por el desarrollo de plataformas que pueda recoger o monitorizar los datos de pacientes.
- Sin duda, aún queda mucho por desarrollar y toda la información que se recoja y descubra supondrá un avance en el diagnóstico de la enfermedad, y servirá para evitar que futuras infecciones alcancen el impacto que esta ha conseguido alcanzar.

6. **BIBLIOGRAFÍA**

- Ade C, Pum J, Abele I, Raggub L, Bockmühl D, Zöllner B. Analysis of cycle threshold values in SARS-CoV-2-PCR in a long-term study. *J Clin Virol*. 2021;138:1-3.
- Adly Aya Sedky, Adly Afnan Sedky, Adly MS. Approaches Based on artificial intelligence and the internet of intelligent things to prevent the spread of COVID-19: Scoping review. *J Med Internet Res* 2020;22:1-15.
- Afzal A. Molecular diagnostic technologies for COVID-19: Limitations and challenges. *J Adv Res* 2020;26:149-159.
- Arandia-Guzmán J, Antezana-Llaveta G. SARS-CoV-2: estructura, replicación y mecanismos fisiopatológicos relacionados con COVID-19. *MGB* 2020;43:170-8.
- Arturo L.G. Enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). *Guía Clínica Fistera*: 2020. [Consultado en Junio 2021]. Disponible en: <https://www--fistera--com.us.debiblio.com/guias-clinicas/covid-19/>.
- Baj J, Karakuła-Juchnowicz H, Teresiński G, Buszewicz G, Ciesielka M, Sitarz E, et al. COVID-19: Specific and Non-Specific Clinical Manifestations and Symptoms: The Current State of Knowledge. *J Clin Med* 2020;9:1753.
- Bautista Moreno R, Arroyo Varela M, Claros MG. Técnicas de detección del SARS-CoV-2 2020;XIII:6-12.
- Bhalla N, Pan Y, Yang Z, Payam AF. Opportunities and Challenges for Biosensors and Nanoscale Analytical Tools for Pandemics: COVID-19. *ACS Nano* 2020;14:7783-7807.
- Böger Msc B, Fachi Msc MM, Vilhena PhD RO, Cobre Msc AF, Tonin PhD FS, Pontarolo PhD R. Systematic review with meta-analysis of the accuracy of diagnostic tests for COVID-19. *Am J Infect Control* 2021;49:21-29.
- Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, et al. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol* 2020;38:870-874.
- Carter LJ, Garner L V., Smoot JW, Li Y, Zhou Q, Saveson CJ, et al. Assay Techniques and Test Development for COVID-19 Diagnosis. *ACS Cent Sci* 2020;6:591-605.
- Chaimayo C, Kaewnaphan B, Tanlieng N, Athipanyasilp N, Sirijatuphat R, Chayakulkeeree M, et al. Rapid SARS-CoV-2 antigen detection assay in comparison with real-time RT-PCR assay for laboratory diagnosis of COVID-19 in Thailand. *Virol J* 2020;17:1-7.
- Chan SK, Du P, Ignacio C, Mehta S, Newton IG, Steinmetz NF. Virus-Like Particles as Positive Controls for COVID-19 RT-LAMP Diagnostic Assays. *Biomacromolecules* 2021;22:1231-1243.
- D’Cruz RJ, Currier AW, Sampson VB. Laboratory Testing Methods for Novel Severe Acute Respiratory Syndrome-Coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *Front Cell Dev Biol* 2020;8:1-11.

- Ejazi SA, Ghosh S, Ali N. Antibody detection assays for COVID-19 diagnosis: an early overview. *Immunol Cell Biol* 2021;99:21-33.
- Engelmann I, Alidjinou EK, Ogiez J, Pagneux Q, Miloudi S, Benhalima I, et al. Preanalytical Issues and Cycle Threshold Values in SARS-CoV-2 Real-Time RT-PCR Testing: Should Test Results Include These? *ACS Omega* 2021;6:6528-6536.
- Feng W, Newbigging AM, Le C, Pang B, Peng H, Cao Y, et al. Molecular Diagnosis of COVID-19: Challenges and Research Needs. *Anal Chem* 2020;92:10196-10209.
- Folorunso Sule W, Oladimeji Oluwayelu D. Real-time RT-PCR for COVID-19 diagnosis: challenges and prospects. *Pan Afr Med J* 2020;35:121.
- Gaus D. COVID-19 : vacunas. *PFR Heal Lat Am* 2021;6.
- Gestoso-Pecellín L, García-Flores Y, González-Quintana P, Marrero-Arencibia JL. Recomendaciones y uso de los diferentes tipos de test para detección de infección por SARS-COV-2. *Enferm Clin* 2020;31:40-48.
- Hirotsu Y, Maejima M, Shibusawa M, Nagakubo Y, Hosaka K, Amemiya K, et al. Comparison of automated SARS-CoV-2 antigen test for COVID-19 infection with quantitative RT-PCR using 313 nasopharyngeal swabs, including from seven serially followed patients. *Int J Infect Dis* 2020;99:397-402.
- Huang WE, Lim B, Hsu CC, Xiong D, Wu W, Yu Y, et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microb Biotechnol* 2020;13:950-961.
- Instituto de Guatemalteco de Seguridad. Protocolo para la utilización de pruebas de detección de antígeno de SARS-CoV-2. Guatemala:IGS; 2020.
- Instituto Nacional de Salud. Precisión diagnóstica de pruebas basadas en amplificación isotérmica mediada en lazo de transcriptasa inversa (RT-LAMP) para SARS-CoV-2. Lima: INS; 2020. N° 8-2020.
- Joung J, Ladha A, Saito M, Segel M, Bruneau R, Huang MLW, et al. Point-of-care testing for COVID-19 using SHERLOCK diagnostics. *medRxiv Prepr Serv Heal Sci* 2020; 20200505: 1-21.
- Lu R, Wu X, Wan Z, Li Y, Zuo L, Qin J, et al. Development of a Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Viol Sin* 2020;35:344-347.
- Martín Alonso M del C, Cano Ochando J, Nistal Villar E, López Hoyos M, González Fernández Á. Técnicas analíticas en COVID-19. *Soc Española Inmunol* 2020:1-58.
- Martín J, Tena N, Asuero AG. Current state of diagnostic, screening and surveillance testing methods for COVID-19 from an analytical chemistry point of view. *Microchem J* 2021;167:106305.

- Mas E, Poza J, Ciriza J, Zaragoza P, Osta R, Rodellar C. Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *Aquat Rev Científica Int Acuic en Español* 2001.
- Mattioli IA, Hassan A, Oliveira ON, Crespilho FN. On the Challenges for the Diagnosis of SARS-CoV-2 Based on a Review of Current Methodologies. *ACS Sensors* 2020;5:3655-3677.
- Ministerio de Sanidad. Información para la Ciudadanía. Gobierno de España: 2020. [Consultado en Junio 2021]. Disponible en: <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/ciudadania.htm>
- Ministerio de Sanidad. Situación actual en España. Gobierno de España: 2020. [Consultado en Junio 2021]. Disponible en: https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/alertasActual/nCov/documentos/Actualizacion_403_COVID-19.pdf
- Mishra T, Wang M, Metwally A, Bogu G, Brooks A, Bahmani A, et al. Early Detection Of COVID-19 Using A Smartwatch. *medRxiv Prepr Serv Heal Sci* 2020:1-31.
- Das Mukhopadhyay C, Sharma P, Sinha K, Rajarshi K. Recent trends in analytical and digital techniques for the detection of the SARS-Cov-2 2020:0301-4622.
- Ohan NW, Heikkila JJ. Reverse transcription-polymerase chain reaction: an overview of the technique and its applications. *Biotechnol Adv* 1993;11:13-29.
- Organización Mundial de la Salud. Vías de transmisión del virus de la COVID-19: repercusiones para las recomendaciones relativas a las precauciones en materia de prevención y control de las infecciones. OMS: 2020. [Consultado en Junio 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/commentaries/detail/modes-of-transmission-of-virus-causing-covid-19-implications-for-ipc-precaution-recommendations>.
- Pang B, Xu J, Liu Y, Peng H, Feng W, Cao Y, et al. Isothermal Amplification and Ambient Visualization in a Single Tube for the Detection of SARS-CoV-2 Using Loop-Mediated Amplification and CRISPR Technology. *Anal Chem* 2020;92:16204-16212.
- Quatieri TF, Talkar T, Palmer JS. A Framework for Biomarkers of COVID-19 Based on Coordination of Speech-Production Subsystems. *IEEE Open J Eng Med Biol* 2020;1:203-206.
- Reina J, Fraile P. Características virológicas y diagnóstico del SARS-CoV-2. *Med Balear* 2020;35:62-68.
- Ruiz-bravo A, Jimenez-Valera M. SARS-CoV-2 y pandemia de síndrome respiratorio agudo (COVID-19). *Ars Pharm* 2020;61:63-79.
- Rusling JF, Liu G. Covid-19 antibody tests and their limitations. *ACS Sensors* 2021;6:593-612.
- Salazar Carranza LA, Maldonado Santacruz FE, Cruz Villegas JA. La PCR como prueba para confirmar casos vigentes de COVID-19. *ReciMundo* 2020;4:64-74.

- Shang Z, Chan SY, Liu WJ, Li P, Huang W. Recent Insights into Emerging Coronavirus: SARS-CoV-2. *ACS Infect Dis* 2020.
- Udugama B, Kadhiresan P, Kozlowski HN, Malekjahani A, Osborne M, Li VYC, et al. Diagnosing COVID-19: The Disease and Tools for Detection. *ACS Nano* 2020;14:3822-3835.
- Vitiello A, Pelliccia C, Ferrara F. Drugs acting on the renin–angiotensin system and SARS-CoV-2. *Drug Discov Today* 2021:1-5.
- Wang J, Cai K, Zhang R, He X, Shen X, Liu J, et al. Novel One-Step Single-Tube Nested Quantitative Real-Time PCR Assay for Highly Sensitive Detection of SARS-CoV-2. *Anal Chem* 2020;92:9399-9404.
- Wang M-Y, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol* 2020;10:1-17.
- World Health Organization. Advice on the use of point-of-care immunodiagnostic tests for COVID-19. Ginebra: WHO; 2020. Serie identificativa: WHO/2019-nCoV/Sci_Brief/POC_immunodiagnosics/2020.1.
- World Health Organization. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using rapid immunoassays. Ginebra: WHO; 2020. Serie identificativa: WHO/2019-nCoV/Antigen_Detection/2020.1 -8-.
- World Health Organization. Pruebas diagnósticas para el SARS-CoV-2.Orientaciones provisionales.Ginebra: WHO; 2020. Serie identificativa: WHO/2019-nCoV/laboratory/2020.6 -21-.
- Xu M, Wang D, Wang H, Zhang X, Liang T, Dai J, et al. COVID-19 diagnostic testing: Technology perspective. *Clin Transl Med* 2020;10:1-15.
- Yu L, Wu S, Hao X, Dong X, Mao L, Pelechano V, et al. Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP). Diagnostic platform. *Clin Chem* 2020;66:975-977.
- Yuan X, Yang C, He Q, Chen J, Yu D, Li J, et al. Current and Perspective Diagnostic Techniques for COVID-19. *ACS Infect Dis* 2020;6:1998-2016.